

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ (DNA-RNA) ΑΠΟ ΤΗ ΦΡΑΟΥΛΑ

ΔΡ ΣΠΥΡΙΔΩΝ ΚΑΒΒΑΔΙΑΣ

1^ο ΓΕΝΙΚΟ ΛΥΚΕΙΟ ΑΡΓΟΣΤΟΛΙΟΥ

ΑΡΓΟΣΤΟΛΙ

ΚΕΦΑΛΟΝΙΑ

2009-10

A) ΣΚΟΠΟΣ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

- **Σκοπός** του πειράματος είναι η απομόνωση των νουκλεϊκών οξέων από τις φράουλες.
- Μετά το τέλος του πειράματος θα τα κρατάτε στα χέρια σας!

B) ΥΛΙΚΑ

- Φράουλες
- Φρέσκος χυμός ανανά
- Παγωμένο νερό
- Μαγειρικό αλάτι
- Υγρό πιάτων συμπυκνωμένο
- Κουτάλια (γλυκού, σούπας)

- Μαχαίρι
- Ομογενοποιητής
- Ποτήρια ζέσεως
- Δοκιμαστικοί σωλήνες
- Πλαστική σύριγγα των 2,5 ml
- Σουρωτήρι
- Παγωμένη αλκοόλη (70-95% ισοπροπυλική ή αιθυλική αλκοόλη)

Γ) ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

ΒΗΜΑ 1: ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗ

Τοποθετήστε στον ομογενοποιητή:

- 1/2 κούπα ψιλοκομμένες φράουλες (~100 ml)
- 1/8 από κουτάλι του τσαγιού μαγειρικό αλάτι
- 200 ml παγωμένο νερό

Ομογενοποιήστε για 15 seconds. Έχετε πλέον στη διάθεσή σας μια «φραουλόσουπα»! (εικ. 1)



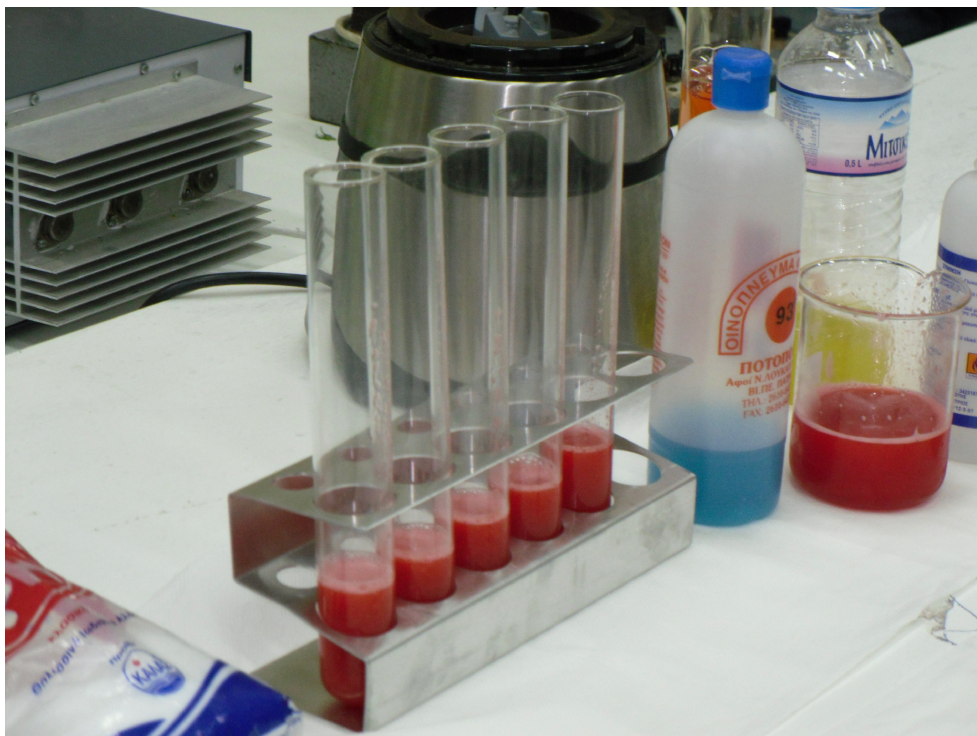
Εικόνα 1. Οι φράουλες έτοιμες για ομογενοποίηση. Διακρίνονται οι δοκιμαστικοί σωλήνες, τα ποτήρια ζέσεως, ο ομογενοποιητής, ο χυμός του ανανά (κίτρινος), το μπλε οινόπνευμα, το υγρό πιάτων και το μαγειρικό αλάτι.



Εικόνα 2. Η «φραουλόσουπα» σουρώνεται...

ΒΗΜΑ 2: ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΥΓΡΟΥ ΠΙΑΤΩΝ

- Σουρώστε τη «σούπα» σε ένα άλλο ποτήρι ζέσεως (εικ. 2).
- Προσθέστε δύο κουταλιές υγρού πιάτων (περίπου 30 ml) και αναδεύστε.
- Αφήστε το μίγμα σε ηρεμία για περίπου 5-10 λεπτά.
- Μοιράστε το μίγμα σε δοκιμαστικούς σωλήνες ώστε ο καθένας να γεμίσει περίπου κατά το 1/3 (εικ. 3).



Εικόνα 3. Το μίγμα έχει μοιραστεί σε δοκιμαστικούς σωλήνες.

ΒΗΜΑ 3: ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΧΥΜΟΥ ΑΝΑΝΑ

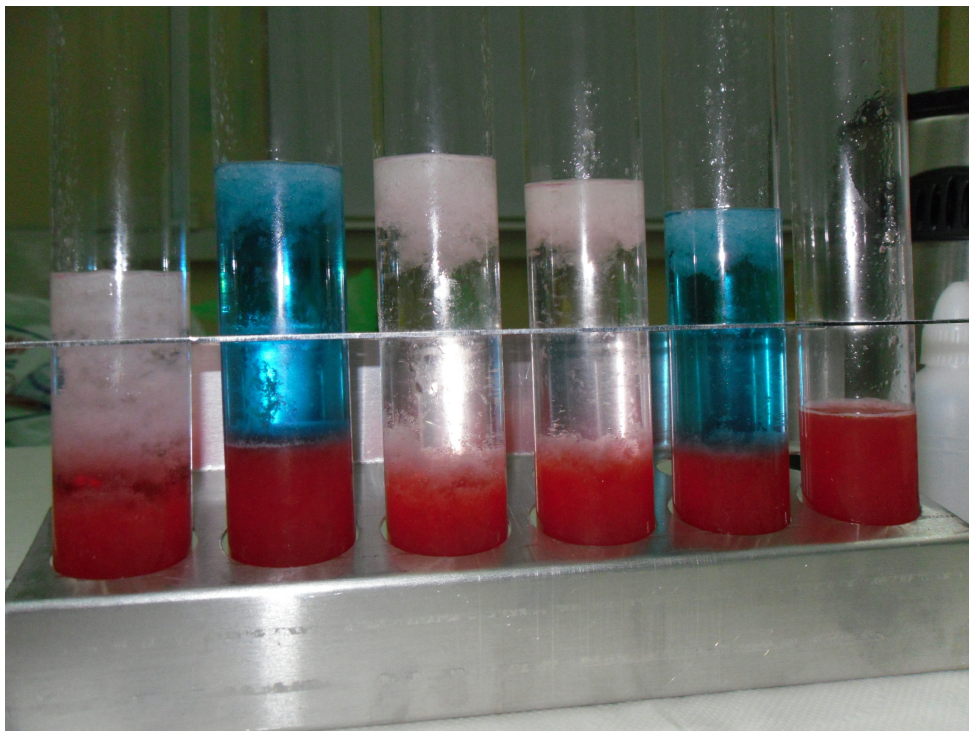
- Προσθέστε με τη σύριγγα λίγες σταγόνες χυμού ανανά σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα και ανακινήστε ήπια.
- Προσοχή! Αν η ανακίνηση είναι βίαιη, θα καταστρέψετε τα νουκλεϊκά οξέα οπότε θα είναι δύσκολο να τα παρατηρήσετε στη συνέχεια.

ΒΗΜΑ 4: ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΑΛΚΟΟΛΗΣ

- Δώστε κλίση στο δοκιμαστικό σωλήνα και προσθέστε αργά την αλκοόλη (αιθυλική ή ισοπροπυλική) ώστε αυτή να ρέει στο τοίχωμα του σωλήνα (εικ. 4). Θα δημιουργηθεί μία στοιβάδα αλκοόλης πάνω από τη «σούπα». Συνεχίστε την προσθήκη μέχρι η ποσότητα της αλκοόλης να είναι περίπου ίση με αυτή της «σούπας».
- Ένα «σύννεφο» θα σχηματιστεί στη στοιβάδα της αλκοόλης (εικ. 5). Είναι τα νουκλεϊκά οξέα που ανέρχονται από τη «φραουλόσουπα»!



Εικόνα 4. Προσθήκη αλκοόλης.



Εικόνα 5. «Σύννεφα» από νουκλεϊκά οξέα στη στοιβάδα της αλκοόλης. Από αριστερά: σωλήνας με ισοπροπυλική αλκοόλη 0°C , σωλήνας με μπλε οινόπνευμα 0°C , σωλήνας με λευκό οινόπνευμα 0°C , σωλήνας με λευκό οινόπνευμα θερμοκρασίας δωματίου, σωλήνας με μπλε οινόπνευμα θερμοκρασίας δωματίου και σωλήνας χωρίς αλκοόλη.

Δ) ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

- *Είναι εφικτή η απομόνωση των νουκλεϊκών οξέων από τη φράουλα με απλό τρόπο και με τη χρήση φτηνών υλικών!*

Ε) ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ

1. *Πώς πραγματοποιείται η διάρρηξη του τοιχώματος των φυτικών κυττάρων; Με την **ανακίνηση** και τη **φυσική δύναμη** του ομογενοποιητή.*
2. *Για ποιο σκοπό προστίθεται το υγρό πιάτων; Κάθε κύτταρο περιβάλλεται από την κυτταρική μεμβράνη. Το DNA περιέχεται στον πυρήνα του κυττάρου που περιβάλλεται από την πυρηνική μεμβράνη. Όλες οι μεμβράνες των κυττάρων έχουν τη δομή της φωσφολιπιδικής διπλοστοιβάδας με πρωτεΐνες. Τα μόρια των φωσφολιπιδίων και του υγρού πιάτων αποτελούνται από δύο μέρη, την υδρόφιλη κεφαλή και την υδρόφοβη ουρά. Σε υδατινό περιβάλλον οργανώνονται σε σφαιρικά συσσωματώματα με τις υδρόφιλες κεφαλές προς τα έξω, σε επαφή με το νερό και τις υδρόφοβες ουρές στο εσωτερικό. Όταν προσεγγίσουν τα μόρια των φωσφολιπιδίων και του υγρού πιάτων, συνδυάζονται και σχηματίζουν «μικτά» συσσωματώματα. Τα μόρια, λοιπόν, του υγρού πιάτων «αιχμαλωτίζουν» τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες των μεμβρανών του κυττάρου.*

3. Ποιος είναι ο ρόλος του παγωμένου νερού στην απομόνωση των νουκλεϊκών οξέων; Η ψύξη **επιβραδύνει** τις ενζυμικές αντιδράσεις. Αυτό προστατεύει το DNA και το RNA από ένζυμα που μπορούν να τα καταστρέψουν (νουκλεάσες). Αυτά τα ένζυμα υπάρχουν στο κυτταρόπλασμα και καταστρέφουν το DNA των ιών όταν αυτό εισέρχεται στο κύτταρο. Το DNA του κυττάρου περιβάλλεται από την κυτταρική μεμβράνη και προστατεύεται από τις νουκλεάσες. Όμως, η μεμβράνη καταστράφηκε μετά από την προσθήκη του υγρού πιάτων, οπότε το DNA εκτέθηκε στις νουκλεάσες.
4. Ποιο ένζυμο περιέχει ο χυμός του ανανά; Περιέχει **βρομελαΐνη**, μια **πρωτεάση**. Το DNA στον πυρήνα πακετάρεται και προστατεύεται από πρωτεΐνες. Η πρωτεάση καταστρέφει τις πρωτεΐνες οπότε απογυμνώνεται το DNA.
5. Για ποιο σκοπό προστίθεται μαγειρικό αλάτι; Το αλάτι εξυπηρετεί την **κατακρήμνιση** των νουκλεϊκών οξέων με την προσθήκη της αλκοόλης. Σχηματίζεται άλας των νουκλεϊκών οξέων με το Na του μαγειρικού αλατιού.
6. Ποιος είναι ο ρόλος της αλκοόλης; Γιατί τα νουκλεϊκά οξέα συσσωματώνονται στη στοιβάδα της αλκοόλης; Η αλκοόλη είναι λιγότερο πυκνή από το νερό και για το λόγο αυτό «επιπλέει». Με την διαμόρφωση δύο στοιβάδων, τα λιπίδια, οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά

οξέα πρέπει να αποφασίσουν: "Χμμ... ποια στοιβάδα πρέπει να επιλέξω;" Τα σφαιρικά συσσωματώματα με τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια επιλέγουν την υδάτινη στοιβάδα του πυθμένα, ενώ τα νουκλεϊκά οξέα επιλέγουν τη στοιβάδα της αλκοόλης. Το DNA και το RNA είναι μακρομόρια που **κατακρημνίζονται** και σχηματίζουν συσσωματώματα με την παρουσία της αλκοόλης. Η αλκοόλη όταν προστίθεται στο διάλυμα δημιουργεί ένα «σύννεφο» γύρω από το DNA και το RNA απομακρύνοντας τα μόρια του νερού. Είναι μόριο λιγότερο πολικό από το νερό (διηλεκτρικές σταθερές νερού 80,1 στους 20°C, αιθανόλης 24,3 και ισοπροπυλικής αλκοόλης 19,92 στους 25 °C). Εξαιτίας της μικρής διηλεκτρικής σταθεράς της, η αλκοόλη, ιδιαίτερα η ισοπροπυλική, συμβάλλει στη δημιουργία σταθερών ιοντικών δεσμών μεταξύ των αρνητικά φορτισμένων φωσφορικών ομάδων των νουκλεϊκών οξέων και των θετικά φορτισμένων ιόντων νατρίου ευνοώντας την κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων με τη μορφή άλατος νατρίου.

$$\text{Νόμος Coulomb } F = \frac{1}{4\pi\epsilon\epsilon_0} \frac{Q_1 \times Q_2}{r^2}$$

Αντικαθιστώντας τις διηλεκτρικές σταθερές για το νερό, την αιθανόλη και την ισοπροπυλική αλκοόλη και διαιρώντας κατά μέλη προκύπτει ότι:

$$F_{\text{αιθανόλης}} = 3,29 \times F_{\text{νερού}}$$

$$F_{\text{ισοπροπυλικής}} = 4,02 \times F_{\text{νερού}}$$

$$F_{\text{ισοπροπυλικής}} = 1,22 \times F_{\text{αιθανόλης}}$$

όπου F η δύναμη Coulomb, ϵ η διηλεκτρική σταθερά του υλικού, ϵ_0 η διηλεκτρική σταθερά του κενού, Q_1 και Q_2 τα σημειακά φορτία και r η μεταξύ τους απόσταση. Ο ισχυρότερος ιοντικός δεσμός σχηματίζεται με την παρουσία της ισοπροπυλικής αλκοόλης που έχει τη μικρότερη διηλεκτρική σταθερά.

Η αλκοόλη προστίθεται «παγωμένη» γιατί η διαλυτότητα των αλάτων στα υγρά μειώνεται με την πτώση της θερμοκρασίας.

7. Το άσπρο «σύννεφο» περιέχει μόνο DNA ή στην πραγματικότητα ένα μίγμα από DNA και RNA; Είναι όντως μίγμα από DNA και RNA.
8. Πόσο θα διαρκέσει η «παρουσία» των νουκλεϊκών οξέων; Τελικά θα αποδομηθούν και θα καταστραφούν; Τα νουκλεϊκά οξέα μπορούν να διατηρηθούν για χρόνια στην αλκοόλη, σε σφραγισμένο δοχείο. Σε περίπτωση ανατάραξης, οι αλυσίδες του DNA σπάνε σε μικρότερα κομμάτια, οπότε καθίσταται δύσκολη η παρατήρησή τους. Αν εξαφανιστούν αυτό οφείλεται πιθανώς στην παρουσία των νουκλεασών που τις καταστρέφουν.
9. Είναι δυνατή η χρήση οπτικού μικροσκοπίου για την παρατήρηση των απομονωμένων νουκλεϊκών οξέων; Η διάμετρος της διπλής έλικας του DNA είναι ένα δισεκατομμυριοστό του μέτρου οπότε είναι **αδύνατη** η χρήση του οπτικού μικροσκοπίου για την παρατήρηση του μορίου. Διακρίνεται μόνο ένα

«σύννεφο» από πολλά μόρια DNA που έχουν συσσωματωθεί. Το μόριο μπορεί να παρατηρηθεί με την **κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ**. Με την τεχνική αυτή παρατήρησε το μόριο η Rosalind Franklin βοηθώντας στη συνέχεια τους James Watson και Francis Crick να διατυπώσουν το μοντέλο της **διπλής έλικας**.

10. *Γιατί η απομόνωση του DNA είναι χρήσιμη για τους επιστήμονες;* Η απομόνωση του DNA από τα κύτταρα είναι το πρώτο βήμα για τη μελέτη των γονιδίων. Το κυτταρικό DNA χρησιμοποιείται ως πρότυπο για τη δημιουργία πολλών **αντιγράφων** (κλώνων) συγκεκριμένου γονιδίου. Οι κλώνοι χρησιμοποιούνται για τη μελέτη της αλληλουχίας και των λειτουργιών των γονιδίων. Αυτό βρίσκει εφαρμογή στη διάγνωση γενετικών ασθενειών. Επιπρόσθετα οι κλώνοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μαζική παραγωγή φαρμακευτικών πρωτεϊνών αλλά και για γονιδιακή θεραπεία. Οι τεχνικές αυτές αναφέρονται ως **τεχνολογία του ανασυνδυσασμένου DNA ή γενετική μηχανική**.

11. *Είναι δυνατή η εφαρμογή του ίδιου πειραματικού πρωτοκόλλου για την απομόνωση του ανθρώπινου DNA;* **Ναι, θεωρητικά**. Χρησιμοποιούνται τα ίδια βασικά υλικά, αλλά χρειάζονται κάποιες τροποποιήσεις, όπως μικρότεροι όγκοι νερού, υγρού πιάτων και αλκοόλης. Και αυτό γιατί δεν είναι δυνατό

να έχουμε στη διάθεσή μας την ίδια ποσότητα ανθρώπινων ιστών όπως με τη φράουλα! Αυτό σημαίνει ότι δεν μπορούμε να απομονώσουμε αρκετά μεγάλη ποσότητα DNA ώστε να την παρατηρήσουμε με το γυμνό μάτι. Η παρατήρηση είναι δυνατή μόνο μετά από φυγοκέντρηση οπότε η πολύ μικρή ποσότητα του ανθρώπινου DNA θα κατακαθίσει στον πυθμένα του δοκιμαστικού σωλήνα.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

<http://learn.genetics.utah.edu/units/activities/extraction/faq.cfm>.

http://en.wikipedia.org/wiki/DNA_extraction